

**Caio Graco Bruzaca**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE OLIGOZOOSPERMIA GRAVE  
E AZOOSPERMIA NÃO OBSTRUTIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

**Caio Graco Bruzaca**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE OLIGOZOOSPERMIA GRAVE  
E AZOOSPERMIA NÃO OBSTRUTIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Renato Fraietta  
Co-orientador: Prof. Dr. Ciro Dresch Martinhago

São Paulo  
2019

Bruzaca, Caio Graco.

Caracterização molecular de oligozoospermia grave e azoospermia não obstrutiva/ Caio Graco Bruzaca. --- São Paulo, 2019.

42 f.: il.

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr. Renato Fraietta

Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Medicina (Urologia), Universidade Federal de São Paulo, 2019.

1. Infertilidade Masculina. 2. Biologia Molecular. 3. Complexo sinaptônômico. I. Fraietta, Renato. II. Título.

CDU: 577

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
DISCIPLINA DE UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista Silva  
Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

**CAIO GRACO BRUZACA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE OLIGOZOOSPERMIA GRAVE E AZOOS-  
PERMIA NÃO OBSTRUTIVA**

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Urologia) junto ao Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).*

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Renato Fraietta (Orientador)  
Médico Urologista e Livre-Docente em Reprodução Humana pela Unifesp

---

Prof. Dr. Ciro Dresch Martinhago (Co-orientador)  
Médico Geneticista e Doutor em Medicina (Obstetrícia) pela Unesp

---

Prof. Dr. Daniel Suslik Zylbersztejn  
Médico urologista e Doutor em Ciências (Urologia) pela Unifesp

---

Prof. Dr. Edson Borges Junior  
Médico Urologista e Doutor em Ciências (Urologia) pela Unifesp

---

Prof. Dr. Décio Brunoni  
Médico Geneticista e Doutor em Ciências Biológicas (Genética) pela UFRJ

---

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla (Suplente)  
Médico veterinário e Livre-Docente em Reprodução Humana pela Unifesp

São Paulo  
2019

Dedicatória

*“Dedico este trabalho a todos os homens que algum dia  
enfrentaram problemas para realizar o sonho de ser pai”.*

## Agradecimentos

A **Deus** por ter me concedido a vida e ter guiado os meus passos nessa trajetória e a **Jesus Cristo** por ter me ensinado o caminho de luz e verdade.

À minha esposa **Wannia Ferreira de Sousa Bruzaca**, pelo amor, companheirismo e cumplicidade, por estar ao meu lado durante esta caminhada e pelo seu incentivo de me fazer uma pessoa cada vez feliz; obrigado, você é a peça principal em minha vida.

À minha mãe, **Maria Quintilha Bruzaca Almeida**, pelo amor e pela preocupação em me garantir uma boa educação ao longo de toda minha vida, pelo incentivo que me faz querer estudar cada vez mais.

Ao meu irmão, **Ruan Didier Bruzaca**, que hoje também dedica sua vida ao ensino, à pesquisa e à extensão, sempre colocando as causas sociais em prioridade.

Às minhas tias **Maria Eli** e **Maria Vitória**, que sempre estão próximas a mim, me ajudando e sempre me apoiando onde quer que eu vá.

Aos meus primos **Janine** e **Wagner Junior** que são como verdadeiros irmãos.

À minha tia **Maria Anida Almeida (Dinda)**, e meus tios **José Ernane**, **Wagner** e **José Raimundo (Zé Dico)**, falecidos, e ao meu tio **João** pela dedicação e contribuição na minha vida.

À **Souphie Charlotte**, por me encher de amor todos os dias no retorno para casa. Também a todos os meus outros cachorros: **Nikito**, **Branquinha**, **Pretinha**, **Pompom** e **Pandora**; apesar da distância, acredito que vocês contribuíram e fizeram parte importante da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Renato Fraietta**, pela orientação na realização do presente trabalho e também pelos ensinamentos em reprodução humana, prontidão e oportunidade.

Ao **Prof. Dr. Ciro Dresch Martinhago**, pela co-orientação na realização do presente trabalho e também pelos ensinamentos na genética médica reprodutiva.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, coordenador do programa de pós-graduação em urologia, pela oportunidade de participar do curso de mestrado acadêmico, por todas as contribuições e ensinamentos ao longo destes dois anos.

À **Enf. Selma Ramos Mesquita** e à **Adcéia Almeida Sá** pela ajuda inestimável durante a coleta de dados e pela colaboração na coleta das amostras deste estudo.

Ao aconselhador genético e amigo **MsC. Alex Marcel Moreira Dias**, por sempre me ajudar, pelos momentos de descontração, por auxiliar nas análises moleculares, revisão do texto final e por todo o apoio ao longo destes anos, foi muito bom trabalhar com você.

Aos laboratoristas **Kalina Renata Naomi Endo, Paula Regina Estrada Queiroz, Gislaine Santos Pereira, Mariana Angelozzi de Oliveira, Daniel Aquilino, Augusto Azzolini de Melo** e **Adriano Bonaldi** pelo auxílio na bancada para obtenção dos dados moleculares.

A **todos os voluntários** que aceitaram participar deste estudo, doando amostra biológica e parte de seu tempo em benefício da ciência.

À **Chromosome® Medicina Genômica**, pelo auxílio tecnológico e financeiro sem o qual não seria possível realizar este trabalho.



*“Meu tempo virá”.*  
*(Gregor Mendel)*

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	6
3. Método.....	9
3.1. Características da população.....	9
3.2. Procedimentos.....	10
3.3. Estratégia de estudo.....	10
3.3.1. Amostras.....	10
3.3.2. Extração de DNA.....	10
3.3.3. Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	10
3.3.3.1. Desenho do Painel Genético.....	10
3.3.3.2. Construção da Biblioteca .....	12
3.3.3.3. Preparo do molde (Template) .....	12
3.3.3.4. Sequenciamento gênico .....	13
3.3.3.5. Análise dos Dados Genômicos.....	13
3.3.3.6 Classificação final das variantes .....	14
3.4. Análise estatística .....	14
4. Resultados.....	16
4.1 Avaliação inicial e antropometria.....	16
4.2. Mensuração do volume testicular médio.....	17
4.3. Avaliação complementar: dosagens hormonais séricas.....	17
4.4. Avaliação complementar: análise seminal segundo a OMS (2010).....	18
4.5. Caracterização molecular dos genes do complexo sinaptonêmico.....	19
4. Discussão.....	26
5. Conclusão.....	29

Referências.....	31
APÊNDICE A: Termo De Consentimento Livre e Esclarecido.....	34
APÊNDICE B: Instrumento de coleta de dados retrospectivos.....	36
ANEXO A: Parecer consubstanciado comitê de ética em pesquisa.....	37

## Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1: Os genes do complexo sinaptonêmico estudados no painel de NGS.	12
Tabela 1: Valores descritivos da avaliação inicial e dados antropométricos.....	16
Tabela 2: Avaliação do volume testicular médio.....	17
Tabela 3: Avaliação <i>post hoc</i> para comparação entre pares (DSCF) do volume testicular médio.....	17
Tabela 4: <i>One-Way</i> Anova de dosagens hormonais séricas.....	18
Tabela 5: Valores descritivos e análise de variância da análise seminal.....	18
Tabela 6: Avaliação <i>post hoc</i> para comparação entre pares (DSCF) da concentração (/ml).....	19
Quadro 2: Variantes encontradas nos controles normozoospermicos.....	20
Quadro 3: Variantes encontradas indivíduos com azoospermia não obstrutiva.....	21
Quadro 4: Variantes encontradas nos indivíduos com oligozoospermia grave.....	22
Quadro 5: Variantes encontradas nos indivíduos com criptozoospermia.....	23
Quadro 6: Classificação das variantes de significado incerto observadas nos pacientes com criptozoospermia.....	25

### Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> – Colégio Americano de Genética médica e Genômica
Array-CGH	<i>Microarray based comparative genomic hybridization</i> – Pesquisa de microrrearranjos por hibridização genômica comparativa
AZF	<i>Azoospermia fator</i> - fatores de azoospermia
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> – regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
CNV	<i>Copy number variation</i> – Variação no número de cópias
DDX3Y	<i>DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked</i> – helicase 3 do DEAD-Box ligado o Y
DNA	Deoxyribonucleic acid – ácido desoxirribonucleico
DSCF	<i>post hoc</i> comparação entre pares Dwass-Stell-Critchlow-Fligner
EPM	Escola Paulista de Medicina
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i> - hormônio folículo-estimulante
IMC	Índice de massa corpórea
LH	<i>Luteinizing hormone</i> - hormônio luteinizante
MIM	<i>Mendelian inheritance in man</i> – catálogo heranças mendelianas no homem (disponível em: <a href="http://www.omim.org">http://www.omim.org</a> )
NGS	<i>Next-generation sequencing</i> – sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – reação de polimerase em cadeia
PGM	<i>Personal Genome Machine</i> – máquina de personalização do genoma
SC	<i>Synaptonemal Complex</i> – complexo sinaptonêmico
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> – polimorfismo de nucleotídeo único
SRY	<i>Sex-determining region Y</i> – Região do Y determinadora do sexo
SYCE1	<i>Synaptonemal Complex Central Element Protein 1</i> – proteína elementar central do complexo sinaptonêmico 1
SYCP1	<i>Synaptonemal Complex Protein 1</i> – proteína do complexo sinaptonêmico 1
SYCP2	<i>Synaptonemal Complex Protein 2</i> – proteína do complexo sinaptonêmico 2
SYCP2L	<i>Synaptonemal Complex Protein 2 Like</i> – proteína semelhante do complexo sinaptonêmico 2
SYCP3	<i>Synaptonemal Complex Protein 3</i> – proteína do complexo sinaptonêmico 3
TMAP	<i>Torrent Mapping Alignment Program</i> – programa de alinhamento e mapeamento do Torrent
TCV	<i>Torrent Variant Caller</i> – chamador de variantes do Torrent
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i> - hormônio estimulante da tireóide
TSPY	<i>Testis-specific Y-encoded protein</i> – proteína transcrita do Y específica do testículo
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP9Y	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 9 Y-Linked</i> – peptidase específica de ubiquinina 9 ligado ao Y.

## Resumo

Muitos casos de infertilidade masculina possuem etiologia indeterminada, mesmo após exaustiva investigação clínica e laboratorial. Há associação entre infertilidade masculina e os genes do complexo sinaptonêmico responsáveis pela sinapse da meiose. Este estudo tem como objetivo descrever variantes nos genes relacionados ao complexo sinaptonêmico. Para tal, foi realizado um sequenciamento de nova geração incluindo os genes *SYCP1*, *SYCP2*, *SYCP2L* e *SYCP3*. Foi utilizada amostra de 14 indivíduos de sexo cromossômico masculino, divididos em quatro grupos: azoospermico não obstrutivo, criptozoospermico, oligozoospermico grave e normozoospermico (controle). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos utilizando as variáveis dependentes relativas a exame físico e exames hormonais, com exceção do volume testicular médio. Observou-se três variantes de significado incerto no grupo criptozoospermia, observado no gene *SYCP2*. Não foram observadas variantes patogênicas ou possivelmente patogênica nos demais genes estudados, tanto em controles quanto em pacientes com infertilidade masculina de causa idiopática. Assim, foram acrescentadas três novas variantes relacionadas ao gene *SYCP2* em pacientes com infertilidade masculina e confirmadas as variantes benignas em controles férteis normozoospermicos.

**Palavras-chave:** Infertilidade Masculina; Biologia Molecular; Complexo sinaptonêmico

## Abstract

Many cases of male infertility present an undetermined etiology, even after exhaustive clinical and laboratory investigations. An association between male infertility and the synaptonemal complex genes responsible for meiosis synapse is observed. In this context, this study aims to describe variants in genes related to the synaptonemal complex. Next generation sequencing was performed comprising the SYCP1, SYCP2, SYCP2L and SYCP3 genes. A sample of 14 chromosomal males was assessed, categorized into four groups: nonobstructive azoospermic, cryptozoospermic, severely oligozoospermic and normozoospermic (control). No significant difference was observed between the groups using dependent variables related to physical and hormonal examinations, except for mean testicular volume. Three variants of uncertain significance were observed in the SYCP2 gene of the cryptozoospermic group. No pathogenic or potentially pathogenic variants were observed in the other assessed genes, both in controls and in patients presenting idiopathic male infertility. Thus, three new variants associated to the SYCP2 gene were added to male infertility cases and benign variants in normozoospermic fertile controls were confirmed.

**Key Words:** Male Infertility; Molecular biology; Synaptonemal complex.





## 1.INTRODUÇÃO

A infertilidade conjugal é atualmente um problema de saúde pública, uma vez que causa ao casal transtornos em todos os âmbitos de vida, tanto biológico, quanto psicossocial, levando inclusive a outros agravos à saúde. Esta é compreendida como a ausência de gravidez mesmo após doze meses de intercursos sexuais, bem distribuídos pelo ciclo, sem uso de proteção. (Messini, 2016).

A infertilidade masculina é marcada por disfunções do aparelho reprodutor. A disfunção do aparelho reprodutor masculino podem ser comprometidas por diversas condições: disfunções sexuais, disfunção ejaculatória, medicamentos, exposição ocupacionais, radiação, e vasectomia. Também há causas intrínsecas que levariam às alterações no espermograma (Berger, et al., 2016).

O espermograma é um exame complementar a ser realizado com coleta de duas amostras. Avalia: o volume do ejaculado, a motilidade, a morfologia e a concentração de espermatozoides; esta quando alterada, é classificada em: oligozoospermia, contagem abaixo de  $15 \times 10^6/\text{mL}$ ; oligozoospermia grave, abaixo de  $5 \times 10^6/\text{mL}$ ; e a azoospermia, ausência de espermatozoides no ejaculado, em duas amostras, mesmo após centrifugação. A azoospermia é classificada em obstrutiva e não obstrutiva (Who, 2010).

Dentre as causas de alterações espermáticas, a varicocele é a mais frequente. Definida como varizes escrotais, levando a uma dilatação anormal das veias espermáticas, do plexo pampiniforme, ou cordão espermático. Pode resultar em atrofia do testículo ipsilateral e assimetria testicular. Não é claro o mecanismo envolvido, entretanto aumento da temperatura testicular, o aumento da pressão venosa, a hipóxia, o estresse oxidativo e a desordem hormonal podem explicar o processo (Chiba, et al., 2016)

Em relação à azoospermia obstrutiva, a agenesia congênita de ductos deferentes (MIM #277280) é a condição intrínseca mais prevalente. Está relacionada às variantes patogênicas em homozigose ou heterozigose composta no gene *CFTR* (MIM \*602412), o mesmo causador da fibrose cística (MIM #219700). É responsável por cerca de 25% das azoospermias obstrutivas, e é decorrente de defeito parcial ou

completo dos derivados do ducto de Wolf. A espermatogênese é normal nesta condição, porém não há espermatozoides no ejaculado (Patat, et al., 2016)

Dentre as causas de azoospermia não obstrutiva está a síndrome de Klinefelter, decorrente de uma polissomia do cromossomo X. Esta condição é caracterizada principalmente por hipogonadismo hipergonadotrófico e atrofia testicular, sendo que o volume testicular máximo em indivíduos adultos é em torno de seis centímetros cúbicos. Podem estar presentes: hábito eunucoide, alta estatura, ginecomastia e disfunções sexuais (Bonomi, et al., 2016; Hotaling e Carrell, 2014).

No fluxograma de investigação da azoospermia não obstrutiva e oligozoospermia grave, uma vez excluído cromossomopatias, é necessária a pesquisa de microdeleções do cromossomo Y. Os fatores de azoospermia (*AZF<sub>a</sub>*, *AZF<sub>b</sub>* e *AZF<sub>c</sub>*; MIM #415.000) estão relacionados a cerca de 10~15% dos casos de ausência de espermatozoides no ejaculado (Yousefi-Razin, et al., 2016; Tournaye, et al., 2016a).

Microdeleções nas regiões de fatores de azoospermia levam a graus variados de oligozoospermia ou azoospermia não obstrutiva. A relação genótipo-fenótipo entre o tipo de deleção e o grau de comprometimento não está completamente elucidada. O padrão ouro para este tipo de diagnóstico são as múltiplas reações de polimerase em cadeia (PCR-multiplex) para as regiões em que estão os fatores de azoospermia. O cromossomo Y é formado por sequências de palíndromos. As regiões *AZFs* são deletadas durante o crossing-over da prófase I na espermatogênese (Krausz, et al., 2013; Krausz, et al., 2014a, Tournaye, et al., 2016b; Yu, et al., 2016).

As regiões *AZFs* são compostas por diversos genes. Em especial, a região *AZF<sub>a</sub>* possui dois genes importantes: *USP9Y* e *DDX3Y*. Variantes patogênicas intragênicas no primeiro gene estão diretamente associadas à azoospermia, visto que seu produto proteico é um modulador fino da espermatogênese. Devido à raridade de mutações específicas dentro das *AZFs*, a prática clínica ainda não incorporou as técnicas de sequenciamento de genes do cromossomo Y, sendo estas restritas à pesquisa. (Krausz, et al., 2011; Ferlin e Floresta, 2014).

Com o advento das novas tecnologias de citogenética molecular, incluindo a hibridização genômica comparativa em microrrearranjos (*Array-CGH*), está ocorrendo uma mudança de paradigmas. Muitos pacientes que teriam como diagnóstico de azoospermia idiopática apresentaram variações de número de cópias (*CNVs*) tanto no cromossomo Y quanto em outros cromossomos em regiões que poderiam influ-

enciar a espermatogênese. (Massaia e Xue, 2017; Krausz, et al., 2014b; Krausz, et al., 2015)

As pesquisas de CNVs têm focado no braço curto do cromossomo Y, que contém além do gene *SRY*, o gene *TSPY1*. Este gene está relacionado ao complexo da superfamília da proteína compreendendo o SET e o NAP, que estão associados ao processo de replicação, sendo inclusive muito expresso na gênese tumoral do gonadoblastoma (Krausz, et al., 2011).

Durante muito tempo o cromossomo Y foi intensamente pesquisado, e o cromossomo X e seus microrrearranjos foram negligenciados no estudo da infertilidade masculina (Krausz, 2012). Entretanto, estudos sobre o cromossomo X já apresentaram diversas CNVs, tanto com ganho quanto com perda de material genético que podem estar relacionadas à azoospermia não obstrutiva.

Comparando ainda técnicas de análise genômica, muitos estudos com *Array-CGH*, análise de sequenciamentos de nova geração, tanto o sequenciamento completo do exoma (*Whole-Exome*) quanto do genoma (*Whole-Genome*), vêm encontrando novas variantes que justificariam ou que elucidariam a causa da infertilidade masculina. Entretanto tais abordagens ainda são incipientes, sendo necessários novos estudos nessa linha (Aston, 2014)

Novos estudos levaram a encontrar genes autossômicos que podem interferir diretamente na produção espermática. O complexo sinaptonêmico (SC) é responsável pelo emparelhamento dos homólogos na meiose: a sinapse. Em especial o gene *SYCP3* (MIM \*604759), localizado no loci 12q23.2, está relacionado à falência espermatogênica tipo 4 (MIM #270960). São descritas alterações em heterozigose levando a perdas gestacionais precoces (entre 6-10 semanas) e à azoospermia. (Bolor, et al., 2009)

Existem mais de 17 subtipos de falência espermatogênica em que alguns subtipos estão associados a genes do SC. Cada subtipo é associado a um gene e a padrão de herança específico. Em especial o *SYCE1* (MIM\*611846), no loci 10q26, com mutações em homozigose/heterozigose composta também leva à falência espermatogênica tipo 15 (MIM #616950) e falência ovariana precoce, por alteração no SC (Geisinger e Benavente, 2016).

A azoospermia decorrente de alterações no SC gera uma parada de maturação durante a meiose, na prófase I. Durante a sinapse, ocorre o emparelhamento dos

homólogos. Não há progressão para as outras fases da meiose. A biópsia testicular mostra-se com espermatócitos I estagnados na forma de paquíteno (Li, 2011).

Em modelo animal, estudos de expressão gênica a partir de biópsia tecidual, mostrou alta expressão do gene *SYCP2* e *SYCP3* em testículo, comparado com outros tecidos como cerebral, hepático ou pele. Utilizando pacientes com biópsia testicular mostrando parada de maturação em espermatócito I, verificou-se que ambos os alelos selvagens do gene *SYCP3* são importantes para completar a espermatogênese (Miyamoto, et al., 2003).

A azoospermia não obstrutiva e a oligozoospermia grave são causas frequentes de infertilidade masculina, ainda assim, poucos estudos na população brasileira são descritos na literatura. Muitos casos ficam diagnosticados como idiopáticos, mesmo depois de concluída avaliação citogenética convencional e estudo molecular das regiões dos fatores de azoospermia. Faz-se necessário avaliar outras técnicas para buscar as causas de infertilidade masculina.



## 2. OBJETIVOS

- Avaliar pacientes, sexo cromossômico masculino, com infertilidade de causa não obstrutiva com novas tecnologias de biologia molecular.
- Realizar sequenciamento de nova geração (NGS) a partir da criação de um painel gênico dos genes relacionados ao complexo sinaptonêmico.
- Descrever as variantes encontradas no painel que possam estar relacionadas à azoospermia não obstrutiva ou à oligozoospermia grave.



### **3. MÉTODO**

Trata-se de um estudo descritivo em uma amostra de indivíduos do sexo masculino, em investigação por azoospermia não obstrutiva ou oligoospermia grave. Os sujeitos de pesquisa foram oriundos dos ambulatórios do Serviço Integrado de Reprodução Humana da Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular da Chromosome® Medicina Genômica.

#### **3.1. Características da população**

Foram estudados os indivíduos do sexo masculino com diagnóstico de azoospermia grave não obstrutiva ou de oligozoospermia grave, em acompanhamento nos ambulatórios do Serviço Integrado de Reprodução Humana do Hospital São Paulo vinculado à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp. Houve limitação quanto à faixa etária, compreendida entre 18 a 50 anos. Tais características compõem os critérios de inclusão. Foram excluídos os casos que apresentam outras causas de azoospermia, hipogonadismo hipogonadotrófico, agenesia bilateral congênita de ductos deferentes, avaliação por citogenética convencional anterior alterada e/ou presença de microdeleção nas regiões de fator de azoospermia (AZFa, AZFb e AZFc), bem como aqueles em que se recusaram na participação no estudo.

#### **3.2. Procedimentos**

Coleta de dados retrospectivos: Houve revisão dos dados clínicos a partir dos prontuários médicos, compreendendo iniciais do paciente, idade, história evolutiva da azoospermia/oligozoospermia grave, histórico familiar e exame físico, especialmente com relação aos achados relativos ao exame urológico. Este exame físico foi realizado por profissional habilitado, além de ter sido avaliado em temperatura adequada (23°C); todos os participantes da pesquisa apresentavam grau II ou III de varicocele. Também foram anotados resultados de exames relevantes ao caso, tais como perfil hormonal, cariótipo e as pesquisas de microdeleção do cromossomo Y.

Destre as variáveis clínicas, foram avaliadas: idade (anos), tempo de união (anos), tempo de infertilidade até a primeira avaliação (anos), estatura (cm), peso (Kg), índice de massa corpórea (IMC; kg/m<sup>2</sup>), volume testicular médio (cm<sup>3</sup>). Também foi avaliado exames complementares, incluindo dosagens hormonais de dosagens: hormônio foliculoestimulante (FSH; iu/L), hormônio luteinizante (LH; iu/L), testosterona total (ng/dL), estradiol sérico (pg/mL), hormônio estimulante da tireoide



(TSH; iu/L) e prolactina (ng/mL). Foi avaliada a análise seminal, com espermograma, segundo a OMS, incluindo: o volume (mL), potencial hidrogeniônico (pH) e concentração (espermatozoides/ml) (Who, 2010).

Coleta de dados prospectivos: As amostras de sangue para obtenção de DNA foram obtidas a partir de punção de veia periférica por profissional habilitado (médico, enfermeira, técnico de enfermagem ou biomédico). Não foi realizado nenhum procedimento *in vivo* que possa causar riscos ou desconfortos. Não foi utilizada amostra de DNA coletada em estudos anteriores e armazenadas. Todas amostras foram descartadas após o término desta pesquisa e não foram armazenadas em nenhum biorrepositório, dispensando a necessidade deste.

### **3.3. Estratégia de estudo**

Após a coleta de sangue periférico em tubo *vacutainer*® com anticoagulante EDTA (cor roxo ou lilás), o DNA genômico foi extraído pelo método de kit-específico utilizado pela clínica *Chromosome*® Medicina Genômica.

#### **3.3.1. Amostras**

Utilizamos pacientes do Serviço Integrado de Reprodução Humana, num total de 14 homens, com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave, com idade compreendida entre 18 a 50 anos.

#### **3.3.2. Extração de DNA**

Essa etapa tem por objetivo obter DNA genômico de elevada qualidade e de concentração apropriada a partir de uma amostra biológica (BOESENBERG-SMITH, 2012). Inicia-se com a liberação do material genético da amostra estudada, seguida da estabilização dos ácidos nucleicos, remoção de inibidores de amplificação e, por último, concentração do DNA num volume útil de solução aquosa compatível com as próximas etapas do protocolo utilizado. A seleção do método de extração deve basear-se em alguns aspectos, tais como, a pureza da amostra de ácidos nucleicos obtida, manuseio, relação custo-benefício e duração. Este procedimento pode ser realizado manualmente ou automaticamente. Nesse projeto, realizamos a extração

do DNA automaticamente, utilizando o QIAcube® (Qiagen, Alemanha) associado a kits de extração em coluna.

O DNA foi extraído utilizando-se o kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen). Brevemente, adiciona-se proteinase K a 200 µL de sangue total e tampão de lise para termos a lise celular e degradação das proteínas e restos das membranas. Este tampão contém altas concentrações de sais, tais como, tiocianato de guanidina e isotiocianato de guanidina, que promovem a adsorção do DNA à membrana de sílica. Os passos seguintes incluem lavagem da membrana. As condições de pH e salinas asseguram que proteínas e outros contaminantes não sejam retidos na membrana de forma a eluir DNA em elevada concentração e bom grau de pureza (*Handbook Qiagen*, 2016).

Por norma, uma amostra de 200 µL de sangue total dá origem a 3 – 12 µg de DNA com uma razão de A260/A280 no intervalo 1,7 – 1,9 (*Handbook Qiagen*, 2016).

### 3.3.3. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Utilizamos a plataforma *Ion Torrent™ Personal Genome Machine* (PGM). O NGS utiliza a estratégia de sequenciamento massivo paralelo de DNA que possibilita a identificação de até bilhões de leituras de uma mesma sequência ao mesmo tempo. As principais vantagens dessa metodologia é sequenciar em uma única corrida múltiplos fragmentos com grande cobertura com o uso mínimo de amostra. (*Handbook AmpliSeq*, 2016).

#### 3.3.3.1. Desenho do Painel Genético

O desenho do painel genético que utilizamos foi feito a partir da plataforma virtual *Ion AmpliSeq Designer* versão 4.24 (*ThermoFisher Scientific*®; <https://ampliseq.com>). No quadro 1 apresentamos o resumo dos dados do painel que foi utilizado tendo como referência o genoma humano (hg19), com um total de 140 *Amplicons* e 2 *Pools* (*Pool 1* = 71 *Amplicons* e *Pool 2* = 69 *Amplicons*).

Quadro 1: Os genes do complexo sinaptonêmico estudados no painel de NGS.

Nome	Localização citogenética	Número de Amplicons	Total de Bases	Bases cobertas	Bases perdidas	Porcentagem de cobertura (%)	Número de éxons
SYCP1	1p13.2	39	3957	3957	0	100	34
SYCP3	12q12.3	12	1219	1219	0	100	11
SYCP2	20q13.33	55	5920	5881	39	99,3	44
SYCP2L	6p24.2	34	3429	3429	0	100	30

### 3.3.3.2. Construção da Biblioteca

Nessa etapa as regiões alvo do DNA são fragmentadas em tamanhos específicos por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos. Outra estratégia de gerar uma biblioteca de fragmentos, que foi escolhida para esse projeto, foi a utilização de *primers* específicos para regiões-alvos de interesse e construir a biblioteca utilizando a técnica de PCR (biblioteca de *Amplicons*).

Cada fragmento gerado corresponde a um molde (*template*). Após fragmentação, adaptadores, que são sequências conhecidas, são incorporados ao molde. Nesta etapa também podem ser inseridos sequências específicas de 5-10 bases para identificação da amostra (*barcodes*), que permite a mistura de diferentes amostras em uma única reação.

A construção das bibliotecas foi realizada a partir de DNA genômico seguindo a metodologia descrita no manual do kit *Ion Ampliseq<sup>TM</sup> Library Kit Plus* (ThermoFisher Scientific).

### 3.3.3.3. Preparo do molde (*Template*)

Na técnica de NGS *Ion Torrent*, a amplificação é realizada por emulsão, onde são gerados micro reatores em uma emulsão de óleo. Essa reação é realizada em pequenas esferas chamada *beads* ou *IonSpheres* recobertas com a sequência complementar ao adaptador. Essas sequências servem para fixar os clones do molde na esfera e também como iniciador da reação de PCR.

O preparo do *template* foi realizado utilizando o equipamento *Ion One Touch System* e o kit *Ion PGM<sup>TM</sup> Template* (ThermoFisher Scientific). Após a quantificação,

as amostras foram diluídas a uma concentração de 10pM e 5 amostras diferentes serão misturadas em um pool equimolar e 25 µL serão utilizados para preparo do *template*. Após essa etapa, o *template* foi enriquecido no equipamento *Ion One Touch™ ES* (ThermoFisher Scientific) para evitar a entrada de *beads* sem DNA no sequenciamento. Após o enriquecimento do produto amplificado, será realizada uma verificação do desempenho utilizando o kit *Ion Sphere™ Quality Control*.

#### 3.3.3.4. Sequenciamento gênico

Esta etapa foi realizada utilizando o kit *Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit* (ThermoFisher Scientific). Este kit contém todos os reagentes necessários para reação de sequenciamento dentro do sistema semicondutor. As amostras foram sequenciadas no chip *Ion 316 Chip Kit v2* (ThermoFisher Scientific) utilizando a plataforma *Ion Torrent™ Personal Genome Machine®*.

Essa tecnologia detecta alterações de pH por meio de reações de polimerização que gera um próton H<sup>+</sup>. Essa alteração é detectada por um transistor e convertido em um sinal elétrico. O número de leituras para cada amostra e a escolha do chip foram decididos em função da quantidade da amostras que foram sequenciadas.

#### 3.3.3.5. Análise dos Dados Genômicos

As análises dos resultados foram realizadas utilizando-se o *Torrent Suite Software* 4.0.2 (Ion Torrent, USA) e alinhadas com o genoma humano referência (hg19) utilizando a ferramenta *Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP). A cobertura do sequenciamento foi revisada utilizando-se o *coverage analysis plugin*.

Utilizou-se a ferramenta para análise de variantes *Torrent Variant Caller* 3.6 (TCV) utilizando-se o TMAP que gerou arquivos BAM (*Binary Alignment Map*). O TCV é uma ferramenta de chamada de variantes de sequências geradas nas plataformas de sequenciamento Ion Torrent. Antes de iniciar-se a análise é necessário criar um *template* de análise contendo as regiões de interesse e outro critérios de qualidade de chamada de bases (alta ou baixa estridência).

As variantes foram analisadas utilizando-se o Ion Reporter Software versão 5.6 e filtradas para evitar a análise de artefatos de sequenciamento.

### **3.3.3.6 Classificação final das variantes**

Os critérios propostos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) foram adotados para classificação das variantes identificadas como provavelmente causais dos quadros de infertilidade masculina.

Para isso, foram analisadas em conjunto as informações sobre as variantes obtidas na etapa de filtragem e na análise de segregação. Variantes missense foram classificadas como descrito por Li e Wang (2017), com o auxílio da ferramenta online Varsome®, que gera automaticamente a classificação da variante de acordo com os critérios propostos pelo ACMG.

Uma vez detectado variantes de efeito desconhecido, independentemente da frequência nos bancos de dados populacionais, foi utilizado ferramentas de predição *in silico*.

## **3.4. Análise estatística**

Para a análise estatística de todas as variáveis dependentes, utilizou-se o teste não paramétrico: análise de variância de Kruskal-Wallis (*One-Way Anova*;  $\chi^2$ ). Este foi realizado para analisar a relação de distribuição das variáveis deste estudo, independentemente da presença de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Em caso haja diferença estatisticamente significativa entre os grupos, será utilizado o *post hoc* para comparação entre pares de Dwass-Stell-Critchlow-Fligner (DSCF).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação inicial e antropometria

Utilizou-se uma amostra de conveniência, sem estudo do tamanho da amostra, com um total de 14 indivíduos do sexo cromossômico masculino, com idade compreendida entre 18 a 50 anos. Dividiu-se em quatro grupos, respectivamente, azoospermia não obstrutiva (n=5), criptozoospermia (n=3), oligozoospermia grave (n=3) e normozoospermia (n=3), de acordo com o espermograma.

Avaliando a amostra, dividida nos quatro grupos (variável independente). Avaliou-se os dados (variável dependente): idade (anos), tempo de união (anos), tempo de infertilidade (anos), estatura (cm), peso (kg) e índice de massa corpórea (IMC; kg/m<sup>2</sup>).

Tabela 1: Valores descritivos da avaliação inicial e dados antropométricos

Variável Dependente	Azoospermia não obstrutiva(n=5)	Criptozoospermia (n=3)	Oligozoospermia grave (n=3)	Normozoospermia (controle) (n=3)	Amostra total (n=14)	Anova ( $\chi^2$ )	df	p
Idade (anos)	37,6±4,34	34,3±3,06	33,0±3,00	32,7±3,79	34,9±3,96	1,75	3	0,191
Tempo de união (anos)	7,6±3,65	13±4,36	4,67±1,53	8,33±1,53	8,29±4,01	7,30	3	0,063
Tempo de infertilidade (anos)	6,8±4,21	3,67±2,08	3,67±2,08	Não se aplica	5,09±3,39	1,70	2	0,427
Estatura (cm)	175±11,6	179±5,57	173±18,5	175±7,02	175±7,7	1,17	3	0,760
Peso (Kg)	81,8±13,4	99,0±19,9	82±2,31	87,7±18,6	86,8±16,5	1,80	3	0,616
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26.6±1.60	31.2±31.2	27,5±6,19	28,8±4,68	28,3±4,87	0,552	3	0,907

A avaliação pelo teste estatístico não paramétrico, análise de variância de Kruskal-Wallis (One-Way Anova), identificou que não há diferença significativa entre os quatro grupos (vide os valores de  $\chi^2$  e p na tabela 2) para todas as variáveis dependentes estudadas.

### 4.2. Mensuração do volume testicular médio

Avaliando a amostra, dividida nos quatro grupos (variável independente), observou-se que o dado volume testicular médio (cm<sup>3</sup>; variável dependente). Avaliando pelo teste estatístico não paramétrico, análise de variância de Kruskal-Wallis (One-

Way Anova), identificou-se que há diferença significativa para a variável dependente volume testicular médio entre os quatro grupos ( $\chi^2=9,35$  e  $p=0,025$ ).

Realizou-se dessa forma o *post hoc* para comparação entre pares de Dwass-Stell-Critchlow-Fligner (DSCF) em que se observou diferença significativa entre os pares: azoospermia e normozoospermia ( $p_{DSCF}=0,021$ ); criptozoospermia e normozoospermia ( $p_{DSCF}=0,037$ ); e criptozoospermia e oligozoospermia grave ( $p_{DSCF}=0,046$ ) sendo a média do volume testicular médio no grupo normozoospermia de  $25\text{cm}^3$  comparado com  $10,5\text{cm}^3$  no grupo azoospermia e  $13\text{cm}^3$  no grupo criptozoospermia.

Tabela 2: Avaliação do volume testicular médio

Variável	Depen-	Azoospermia	Criptozoospermia	Oligozoospermia	Normozoospermia	Amostra	Anova	df	p
dente		não obstrutiva (n=5)	(n=3)	grave (n=3)	(controle) (n=3)	total (n=14)	( $\chi^2$ )		
Volume testicular (cm <sup>3</sup> )	testi- médio	10,5±6	13,0±0,5	20±4,33	25±0	16,2±7,08	9,35	3	0,025

Tabela 3: Avaliação *post hoc* para comparação entre pares (DSCF) do volume testicular médio

Comparação entre pares - Volume testicular médio (cm<sup>3</sup>)

		W	p
Azoospermia	Criptozoospermia	1.91	0.177
Azoospermia	Oligozoospermia grave	2.35	0.097
Azoospermia	Normozoospermia	3.26	0.021
Criptozoospermia	Oligozoospermia grave	2.82	0.046
Criptozoospermia	Normozoospermia	2.95	0.037
Oligozoospermia grave	Normozoospermia	2.24	0.114



#### 4.3. Avaliação complementar: dosagens hormonais séricas

Foi realizada avaliação hormonal de todos os participantes da amostra. Avaliou-se as dosagens de hormônio foliculoestimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona total, estradiol, e prolactina.

Tabela 4: *One-Way* Anova de dosagens hormonais séricas.

Variável Dependente	Azoospermia não obstrutiva (n=5)	Criptozoospermia (n=3)	Oligozoospermia grave (n=3)	Normozoospermia (controle) (n=3)	Amostra total (n=14)	Anova ( $\chi^2$ )	df	P
FSH (iu/L)	18,6±10,7	24,3±14,4	11,0±6,52	4,75±3,54	14,5±10,7	6,26	3	0,100
LH (iu/L)	9,29±4,35	6,0±1,71	6,73±1,07	5,98±4,16	7,43±3,47	1,43	3	0,700
Testosterona total (ng/dL)	422±212	562±127	504±350	395±79	456±204	1,73	3	0,630
Estradiol (pg/mL)	35,1±27,4	33±19,8	27,5±4,45	28,3±1,53	31,5±17,3	0,129	3	0,940
TSH (iu/L)	2,0±0,582	1,54±0,304	1,69±0,395	2,71±2,01	2,02±1,03	1,560	3	0,669
Prolactina (ng/mL)	16,8±13,9	10,9±2,86	13,1±8,36	13±9,68	13,0±9,4	0,429	3	0,934

A avaliação pelo teste estatístico não paramétrico, análise de variância de Kruskal-Wallis (*One-Way* Anova), identificou que não há diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos (vide os valores de  $\chi^2$  e p na tabela 5) para estas todas os dados hormonais (variável dependente).

#### 4.4. Avaliação complementar: análise seminal segundo a OMS (2010).

Foi realizada a análise seminal, com espermograma, segundo a OMS (2010). Avaliou-se o volume (mL), potencial hidrogeniônico (pH) e concentração (espermatozoides/mL).

Tabela 5: valores descritivos e análise de variância da análise seminal

Variável Dependente	Azoospermia (n=5)	Criptozoospermia (n=3)	Oligozoospermia grave (n=3)	Normozoospermia (controle) (n=3)	Amostra total (n=14)	Anova ( $\chi^2$ )	df	p
Volume (ml)	2,34±0,907	4,1±2,02	2,7±0,3	3,13±1,1	3±1,29	2,94	3	0,401
pH	8,2±0,274	8,33±0,289	8,17±0,289	8,33±0,289	8,23±0,259	1,11	3	0,774
Concentração (espermatozoides/ml)	Zero	7±5,2	1,47x10 <sup>6</sup> ±1,16 x10 <sup>6</sup>	79,8x10 <sup>6</sup> ±8,25 x10 <sup>6</sup>	----	12,3	3	0,005

Utilizando o teste não paramétrico, análise de variância de Kruskal-Wallis (One-Way ANOVA), observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos para as variáveis dependentes: volume ejaculado (mL;  $\chi^2=2,94$ ;  $p=0,401$ ) e potencial hidrogeniônico (pH;  $\chi^2=0,774$ ;  $p=0,005$ ).

Tabela 6: Avaliação *post hoc* para comparação entre pares (DSCF) da concentração (/ml).

Comparação entre pares - Concentração (/ml)

		W	p
Azoospermia	Criptozoospermia	3.65	0.010
Azoospermia	Oligozoospermia grave	3.62	0.010
Azoospermia	Normozoospermia	3.62	0.010
Criptozoospermia	Oligozoospermia grave	2.82	0.046
Criptozoospermia	Normozoospermia	2.82	0.046
Oligozoospermia grave	Normozoospermia	2.78	0.050

Quanto à concentração (espermatozoide/mL; variável dependente) realizou-se o teste de Kruskal-Wallis (One-Way ANOVA) em que identificou que há diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos ( $\chi^2=11,7$ ;  $p=0,008$ ).

Realizou-se dessa forma o *post hoc* para comparação entre pares de Dwass-Stell-Critchlow-Fligner (DSCF) em que se observou diferença significativa entre os pares (vide tabela 7). A concentração de espermatozoide média no grupo normozoospermia foi de  $79 \times 10^6$ /mL, superior ao grupo oligozoospermia que foi de  $1,47 \times 10^6$ /mL; grupo criptozoospermia foi de 7/mL e azoospermia de zero/mL, como era de se esperar.

#### 4.5 Caracterização molecular dos genes do complexo sinaptonêmico.

Foi realizado um painel gênico, envolvendo os genes por sequenciamento de nova geração (NGS). Confirmou-se variantes benignas previamente descritas em estudos populacionais em genética. Estas variantes foram observada nos controles com espermograma apresentando normozoospermia.

Nos três indivíduos, as variantes abrangeram os genes *SYCP1*, *SYCP2L* e *SYCP3*. Não foi observada nenhuma variante no gene *SYCP2*. As variantes observadas eram equivalentes, *missense* ou intrônicas. Estas variantes não prejudicavam as proteínas do complexo sinaptonêmico (vide quadro 2).

Quadro 2: Variantes encontradas nos controles normozoospermicos.

	Gene	Posição	Variante (nomenclatura HGVS <sup>1</sup> )	dbSNP	Zigose	Significado Clínico
<b>Nº12</b>	<i>SYCP1</i>	chr1:115399884	c.225C>T / p.Pro75=	rs17544210	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Homozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10906256	c.645A>G / p.Lys215=	rs4713039	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna
<b>Nº13</b>	<i>SYCP1</i>	chr1:115399884	c.225C>G / p.Pro75=	rs17544210	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10942964	c.1939A>G / p.Asn647Asp	rs3798751	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Heterozigose	Benigna
<b>Nº14</b>	<i>SYCP2L</i>	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna
	<i>SYCP2L</i>	chr6:10958997- 10958999	c.2164-20_2164- 18delTTA	rs141480785	Heterozigose	Benigna
	<i>SYCP3</i>	chr12:102131564	c.133+17G>T	rs3751248	Heterozigose	Benigna

No grupo azoospermia não obstrutiva (compreendendo os indivíduos número 1 ao 5), não foram observadas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas neste grupo. Foram observadas variantes benignas e possivelmente benignas nos grupos azoospermia não obstrutiva, incluindo variantes observadas nos controles normozoospermicos, vide quadro 3.

No grupo oligozoospermia (compreendendo os indivíduos número 9 ao 11), não foram observadas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas neste grupo. Foram observadas variantes benignas e possivelmente benignas nos grupo oligozoospermia, incluindo variantes observadas nos controles normozoospermicos, vide quadro 4.

No grupo criptoospermia (compreendendo os indivíduos número 6 ao 8), não foram observadas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas neste grupo. Foram observadas variantes benignas e possivelmente benignas nos grupos

azoospermia não obstrutiva, incluindo variantes observadas nos controles normozoospermicos, entretanto foi observada variantes de significado incerto (VUS), vide quadro 5.

Quadro 3: Variantes encontradas em indivíduos com azoospermia não obstrutiva

	Gene	Posição	Variante (nomenclatura HGVS <sup>1</sup> )	dbSNP	Zigose	Significado Clínico
<b>Nº1</b>	SYCP2L	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10958997- 10958999	c.2164-20_2164- 18delTTA	rs141480785	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2	chr20:58441612	c.4158G>A / p.Thr1386=	rs58905758	Heterozigose	Provavelmente Benigna
	SYCP2	chr20:58475307	c.1290C>T / p.Val430=	rs6027185	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58476774	c.1125C>T / p.Asp375=	rs6027186	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58496438	c.95T>C / p.Ile32Thr	rs61730337	Heterozigose	Provavelmente Benigna
<b>Nº2</b>	SYCP2L	chr6:10894381	c.280G>A / p.Val94Ile	rs6456746	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10930731	c.1617C>T / p.Thr539=	rs61741402	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10958997- 10958999	c.2164-20_2164- 18delTTA	rs141480785	Heterozigose	Benigna*
	SYCP3	chr12:102127371	c.435A>G / p.Glu145=	rs78591432	Heterozigose	Provavelmente benigna
<b>Nº3</b>	SYCP2L	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10906256	c.645A>G / p.Lys215=	rs4713039	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
<b>Nº4</b>	SYCP2L	chr6:10906256	c.645A>G / p.Lys215=	rs4713039	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10942964	c.1939A>G / p.Asn647Asp	rs3798751	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna
<b>Nº5</b>	SYCP2L	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Heterozigoto	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna

\*Variante presente nos controles com normozoospermia.

Quadro 4: Variantes encontradas em indivíduos com oligozoospermia grave.

	Gene	Posição	Variante (nomenclatura HGVS <sup>1</sup> )	dbSNP	Zigose	Significado Clínico
<b>Nº9</b>	SYCP1	chr1:115537343	c.2728T>C / p.Leu910=	rs17033011	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10894381	c.280G>A / p.Val94Ile	rs6456746	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10928643	c.1448C>T / p.Pro483Leu	rs150159592	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10942964	c.1939A>G / p.Asn647Asp	rs3798751	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10958997- 10958999	c.2164-20_2164- 18delTTA	rs141480785	Heterozigose	Benigna*
<b>Nº10</b>	SYCP2L	chr6:10894381	c.280G>A / p.Val94Ile	rs6456746	Heterozigose	Benigna
	SYCP2L	chr6:10912920	c.933G>A / p.Ala311=	rs73723610	Heterozigoto	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10930731	c.1617C>T / p.Thr539=	rs61741402	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10958997- 10958999	c.2164-20_2164- 18delTTA	rs141480785	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58475307	c.1290C>T / p.Val430=	rs6027185	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58476774	c.1125C>T / p.Asp375=	rs6027186	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58496438	c.95T>C / p.Ile32Thr	rs61730337	Heterozigose	Provavelmente benigna
<b>Nº11</b>	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2	chr20:58452566	c.3024G>A / p.Pro1008=	rs61730343	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2	chr20:58475307	c.1290C>T / p.Val430=	rs6027185	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58476774	c.1125C>T / p.Asp375=	rs6027186	Heterozigose	Benigna

\*Variante presente nos controles com normozoospermia.

Quadro 5: Variantes encontradas em indivíduos com criptozoospermia.

	Gene	Posição	Variante (nomenclatura HGVS <sup>1</sup> )	dbSNP	Zigose	Significado Clínico
Nº6	SYCP2L	chr6:10930731	c.1617C>T / p.Thr539=	rs61741402	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58452566	c.3024G>A / p.Pro1008=	rs61730343	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2	chr20:58455447	c.2852T>C / p.Ile951Thr	rs151163205	Heterozigose	Efeito desco- nhecido
	SYCP2	chr20:58475307	c.1290C>T / p.Val430=	rs6027185	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58476774	c.1125C>T / p.Asp375=	rs6027186	Heterozigose	Benigna
Nº7	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna
Nº8	SYCP2L	chr6:10894255	c.216+18G>A	rs9368453	Heterozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10955408	c.2014C>T / p.Pro672Ser	rs1225746	Homozigose	Benigna*
	SYCP2L	chr6:10961649	c.2355+12T>C	rs9791208	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58442826	c.4065G>T / p.Gly1355=	rs6070981	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2	chr20:58442921- 58442923	c.3989-21_3989- 19delCAG	rs142112394	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2	chr20:58452582	c.3008T>C / p.Met1003Thr	rs61733222	Heterozigose	Efeito desco- nhecido
	SYCP2	chr20:58456564- 58456566	c.2659-18_2659- 17insAAT	rs148253329	Heterozigose	Efeito desco- nhecido
	SYCP2	chr20:58467157	c.2252C>T / p.Thr751Ile	rs6071006	Heterozigose	Provavelmente benigna
	SYCP2	chr20:58476774	c.1125C>T / p.Asp375=	rs6027186	Heterozigose	Benigna
	SYCP2	chr20:58486796	c.972+9A>C	rs6071026	Heterozigose	Provavelmente benigna

\*Variante presente nos controles com normozoospermia.

A variante no gene *SYCP2* c.2852T>C / p.Ile951Thr (rs151163205) é uma variante *missense*, em que houve uma troca de aminoácidos; esta variante possui frequência de 0,2%, não sendo considerada um polimorfismo. Esta variante não está descrita no ClinVar®. O preditor de patogenicidade de variante DANN apresenta-se como causador de doença (score 0,9978); o preditor *in silico* SIFT (*sorts intolerant from tolerant*) apresenta-se como patogênico (score 0,002 e *converted rankscore* 0,7209); vide quadro 6.

A segunda e terceira variantes foram descritas no mesmo paciente. A segunda variante no gene *SYCP2* c.3008T>C/p.Met1003Thr (rs61733222) é uma variante *missense*, em que houve troca de aminoácidos; esta variante possui frequência de

1,2%, podendo ser considerada um polimorfismo. Esta variante não está descrita no ClinVar®. O preditor de patogenicidade de variante DANN apresenta como mutação tolerada (score 0,2691); o preditor *in silico* SIFT (*sorts intolerant from tolerant*) apresenta-se como tolerada (score 0,235 e *converted rankscore* 0,2716); vide quadro 6.

A terceira variante no gene *SYCP2* c.2659-18\_2659-17insAAT (rs148253329) é uma inserção equivalente intrônica, em que houve inserção de aminoácidos; esta variante possui frequência de 0,36%, não podendo ser considerada um polimorfismo. Esta variante não está descrita no ClinVar®. O preditor de patogenicidade de variante *Genomic Evolutionary Rate Profiling* (GERP) apresenta como mutação tolerada (NR=5 e RS=3.88); vide quadro 6.

Quadro 6: classificação das variantes de significado incerto observadas nos pacientes com criptozoospermia.

	Probandos		
	Indivíduo 6 (criptozoospermia)	Indivíduo 8 (criptozoospermia)	
Cobertura >10X (%)	95,9	97,5	95,9
Gene	SYCP2 (MIM#604.105)		
Fenótipo OMIM	Até o momento nenhum fenótipo descrito		
RefSeq	NM_014258.4	NM_014258.3	NM_014258.2
Posição	chr20:58455447	chr20:58452582	chr20:58456564-58456566
DNA	c.2852T>C	c.3008T>C	c.2659-18_2659-17insAAT
Proteína	p.Ile951Thr	p.Met1003Thr	Mutação intrônica
dbSNP	rs151163205	rs61733222	rs148253329
Genótipo	Heterozigose	Heterozigose	Heterozigose
gnomAD Genomes	0,00223	0,0207	0,0204
1000 Genomes	0	0	0
Exome Variant Server	0	0	0
ExAC	0,007467	0,02084	0,005541
ABraOM	0,002463	0,023810	0,023888
ClinVar - classificação	ND	ND	ND
DANN	Score 0,9978	ND	ND
GERP (Conservation)	4,76	5,8	NR 5 NS 3,88
SIFT	0,002-Damaging 0,4139-rankscore	0,001-Damaging	0,0-Damaging
Polyphen-2	0,873-possibly-damaging	benign:0.0	Unknown
Mutation taster	Disease causing Accuracy 0,6755	Polymorphism Accuracy 1	Unknown
Análise de segregação	NR	NR	NR
Crítérios - ACMG	PP3	BP4	Nenhum
Classificação - ACMG	<b>Efeito desconhecido</b>	<b>Efeito desconhecido</b>	<b>Efeito desconhecido</b>
Legenda: ND - não descrito / NA - não se aplica / NR - não realizada			





## 5. DISCUSSÃO

Em muitos casos de azoospermia não obstrutiva, oligozoospermia grave e criptozoospermia, mesmo com exaustiva investigação e utilização de um arsenal clínico e de propedêutica complementar; o diagnóstico etiológico é tido como idiopático. Erros durante a meiose I da gametogênese podem estar relacionadas à infertilidade masculina e sub-fertilidade feminina (Li et al., 2011).

O complexo sinaptonêmico é essencial para a progressão da meiose I e, consequentemente, formação dos gametas. Em modelo animal, observou-se parada de maturação na espermatogênese em ratos com variantes patogênicas nos genes *SYCP2* e *SYCP3* (Yang, et al, 2006).

Em homens com azoospermia não obstrutiva e parada de maturação espermática na biopsia testicular, já foram descritas variantes patogênicas nos genes relacionados ao complexo sinaptonêmico: *SYCP3* e *SYCE1*. Esta poderia ser uma possível causa de infertilidade masculina. Inicialmente foi descrita com frequência de 10,5% em homens com azoospermia não obstrutiva e parada de maturação espermática (Miyamoto et al., 2003). Mas, a frequência de mutações do complexo sinaptonêmico possivelmente é muito inferior (Geisinger e Benavente, 2016).

Um estudo envolvendo 75 indivíduos azoospermicos não-obstrutivos de etnia turca não identificou nenhuma variante patogênica ou possivelmente patogênica no gene *SYCP3* utilizando sequenciamento Sanger (Gurkan et al., 2012). Assim como o resultado deste estudo, uma vez que realizado o sequenciamento do gene *SYCP3*, não foi encontrada nenhuma variante patogênica ou possivelmente patogênica, na amostra estudada.

Ainda relacionado ao gene *SYCP3*, um estudo na Bélgica com 58 indivíduos com parada de maturação na espermatogênese, e repetido pelo mesmo grupo com uma amostra maior, também não identificou quaisquer variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas no gene estudado (Stouffs et al., 2005; Stouffs et al. 2011).

Outro estudo também não identificou nenhuma variante patogênica ou possivelmente patogênica no gene *SYCP3* em homens inférteis (Martínez et al., 2007).

Por conseguinte, é sugerido que variantes patogênicas no gene *SYCP3* podem ser um fator determinante ou um fator predisponente para a susceptibilidade de não-disjunção meiótica, assim como na determinação de infertilidade masculina e subfertilidade feminina (Nishiyama et al., 2011).

A estrutura tridimensional do complexo sinaptonêmico é composta por dois elementos que conectam as cromátides irmãs, são estas as proteínas *SYCP3* e a *SYCP2* (Yang et al., 2006). Um erro durante o transcrito no gene *SYCP2* nos espermátocitos levam à falha na sinapse durante a prófase I, visto que a proteína codificada do gene *SYCP2* é responsável pela ponte que mantém ligado o complexo sinaptonêmico e o centrômero (Feng et al., 2017).

Na amostra estudada, observou-se três variantes de significado incerto, no gene *SYCP2*, nunca descritas no ClinVar®, ambas em indivíduos apresentando criptozoospermia. Até o presente estudo, não foram observadas nenhuma variante patogênica no gene *SYCP2*; diferentemente do que se observou no gene *SYCP3* (Geisinger e Benavente, 2016).

A etiologia da infertilidade masculina ainda é um desafio durante a investigação do casal infértil. Apesar de já haverem muitos genes candidatos e outros relacionados à infertilidade masculina, estes ainda são somente utilizados na pesquisa científica. Até a presente data, ainda não há um grau de evidência que comprove sua utilização na prática clínica.

Embora seja baixa a frequência de mutações nos genes do complexo sinaptonêmico em homens com azoospermia não obstrutiva, criptozoospermia e oligozoospermia grave, o alto custo é o maior impeditivo da elaboração de um estudo em larga escala. Este estudo pode ser um início para estudos maiores que demonstrem relações contundentes entre o complexo sinaptonêmico e a infertilidade masculina. Desta forma, mais estudos são necessários para entender a caracterização molecular de infertilidade masculina, bem como a função dos genes e a descrição das variantes encontradas.



## 6.CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que:

- Não foram observadas variantes patogênicas, possivelmente patogênicas e de significado incerto (VUS) nos genes *SYCP1*, *SYCP2L* e *SYCP3* tanto em controles quanto em pacientes com infertilidade masculina de causa idiopática;
- Três novas variantes foram acrescentadas relacionadas ao gene *SYCP2* em pacientes com infertilidade masculina;
- As variantes benignas foram confirmadas em controles férteis normozoospermicos.



## REFERÊNCIAS

- Aston KI. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. *Andrology*. 2014;2(3):315-21.
- Berger MH, Messore M, Pastuszak AW, Ramasamy R. Association Between Infertility and Sexual Dysfunction in Men and Women. *Sex Med Rev*. 2016 Oct;4(4):353-365.
- Bolor H, Mori T, Nishiyama S, Ito Y, Hosoba E, Inagaki H, Kogo H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Kitaoka E, Sawada T, Nishiyama Y, Udagawa Y, Kurahashi H. Mutations of the SYCP3 gene in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Hum Genet*. 2009 Jan;84(1):14-20.
- Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, Balercia G, Jannini EA, Ferlin A; Klinefelter Italian Group (KING). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2017 Feb;40(2):123-134.
- Chiba K, Ramasamy R, Lamb DJ, Lipshultz LI. The varicocele: diagnostic dilemmas, therapeutic challenges and future perspectives. *Asian J Androl*. 2016 Mar-Apr;18(2):276-81.
- Feng J, Fu S, Cao X, Wu H, Lu J, Zeng M, Liu L, Yang X, Shen Y. Synaptonemal complex protein 2 (SYCP2) mediates the association of the centromere with the synaptonemal complex. *Protein Cell*. 2017 Jul;8(7):538-543.
- Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2014 Jun;26(3):193-8.
- Geisinger A, Benavente R. Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenet Genome Res*. 2016;150(2):77-85.
- Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*. 2014;2(3):339-50.
- Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*. 2015;150(5):R159-74.
- Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014;2(1):5-19.a
- Krausz C, Chianese C. Genetic testing and counselling for male infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(3):244-50.b
- Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, Ruiz-Castane E, Forti G, Rossi E. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. *PLoS One*. 2012;7(10):e44887.
- Krausz C, Chianese C, Giachini C, Guarducci E, Laface I, et al. The Y-chromosome-linked copy number variations and male fertility. *J Endocrinol Invest* 2011;34:376–382.
- Li XC, Bolcun-Filas E, Schimenti JC. Genetic evidence that synaptonemal complex axial elements govern recombination pathway choice in mice. *Genetics*. 2011 Sep;189(1):71-82.

Li, Q., & Wang, K. (2017). InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *American journal of human genetics*, 100(2), 267–280.

Massaia A, Xue Y. Human Y chromosome copy number variation in the next generation sequencing era and beyond. *Hum Genet*. 2017 May;136(5):591-603. doi: 10.1007/s00439-017-1788-5. Epub 2017 Apr 4. Review.

Messini CI, Daponte A, Anifandis G, Mahmood T, Messinis IE. Standards of Care in infertility in Europe. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Oct 20. pii: S0301-2115(16)30951-4.

Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. Azospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1714-9.

Nishiyama S, Kishi T, Kato T, Suzuki M, Bolor H, Nishizawa H, Iwata N, Udagawa Y, Kurahashi H. A rare synaptonemal complex protein 3 gene variant in unexplained female infertility. *Mol Hum Reprod*. 2011 Apr;17(4):266-71.

Patat O, Pagin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, Monteil L, Gaston V, Bujan L, Courtade-Saïdi M, Marcelli F, Lalau G, Rigot JM, Mieusset R, Bieth E. Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Am J Hum Genet*. 2016 Aug 4;99(2):437-42.

Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. SYCP3 mutations are uncommon in patients with azospermia. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84(4):1019-20.

Stouffs K, Vandermaelen D, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W. Mutation analysis of three genes in patients with maturation arrest of spermatogenesis and couples with recurrent miscarriages. *Reprod Biomed Online*. 2011 Jan;22(1):65-71.

Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016 Jul 6. pii: S2213-8587(16)30040-7.

Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Concepts in diagnosis and therapy for male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016 Jul 6. pii: S2213-8587(16)30043-2.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press;2010.

Yousefi-Razin E, Nasiri MJ, Omrani MD. Frequency of Y Chromosome Microdeletions Among Iranian Infertile Men with Azoospermia and Severe Oligozoospermia: A Meta-analysis. *J Reprod Infertil*. 2016 Oct-Dec;17(4):208-212.

Yu XW, Wei ZT, Jiang YT, Zhang SL. Y chromosome azospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azospermic and severe oligozoospermic patients. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Sep 15;8(9):14634-46. eCollection 2015.

Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol*. 2006 May 22;173(4):497-507.



## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização molecular de azoospermia não obstrutiva e oligozoospermia grave

Caio Graco Bruzaca A. Vilela, Ciro Dresch Martinhago e Renato Fraietta

Número do CAAE: 79340617.1.1001.5505

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador responsável, ambas de mesmo valor jurídico e fé pública.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

#### Justificativa e objetivos:

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque a sua investigação de azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave apresentaram avaliação com perfis hormonais, citogenética convencional e pesquisas de microdeleção do cromossomo Y como sem alterações. A azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave é uma importante causa de infertilidade masculina, há poucos estudos sobre o uso de novas técnicas de biologia molecular que busquem novas bases genéticas dessa alteração. O objetivo deste estudo é utilizar tecnologias de sequenciamento de nova geração e citogenética molecular a fim de identificar alterações que possam ser responsáveis pela azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave.

#### Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a permitir que os pesquisadores utilizem as informações que já estão registradas no prontuário, como idade, história da investigação da infertilidade, antecedentes na família e descrição do exame físico. Além disso, será coletado sangue periférico para extração e utilização do seu DNA, em um total máximo de 12 ml. A partir deste material genético será investigado alterações em genes causadores de azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave, excluídas as regiões de fator de azoospermia, ao qual você já realizou durante atendimento no Serviço de Reprodução Humana.

#### Desconfortos e riscos:

O risco para este estudo é semelhante a qualquer coleta de sangue. Pode haver desconforto na coleta do sangue como dor e pequeno sangramento, que na maioria dos casos é controlado com pressão local. Mesmo assim, há risco de formação de hematoma (mancha roxa). Todos são efeitos passageiros e considerados de baixo risco. Essa coleta será feita no dia da consulta médica no ambulatório por enfermeira ou médico.

#### Benefícios:

Os resultados do estudo podem ter benefícios futuros para outros homens inférteis, mas também poderão ter benefícios diretos a você no que se refere à elucidação diagnóstica da causa da infertilidade, que poderá ser utilizada para fins de aconselhamento genético. Esse aconselhamento genético, se solicitado, será feito durante consulta médica no ambulatório de Reprodução Humana, pelo pesquisador responsável, que é médico geneticista titulado e profissional apto para tal.

#### Ressarcimento e direito a indenização:

Todos os procedimentos serão feitos apenas uma vez e nas datas de consulta médica no Ambulatório de Reprodução Humana, de modo que não está previsto o ressarcimento de despesas. Não é previsto o pagamento de indenização, uma vez que os procedimentos serão realizados na rotina do serviço, mas caso você se sinta prejudicado de alguma maneira, é garantido o direito de solicitar recurso.

#### Acompanhamento e assistência:

O acompanhamento clínico no ambulatório de Reprodução Humana é garantido, independentemente do aceite de participação da pesquisa proposta ou que você resolva interromper a participação no estudo, a qualquer momento.

**Sigilo e privacidade:**

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. As informações médicas que forem obtidas para esse estudo poderão ser registradas no prontuário, tornando-se disponíveis para outros médicos que possam atendê-lo no futuro.

**Armazenamento de material:**

O DNA obtido será usado exclusivamente para este estudo sobre alterações genéticas relacionadas à azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave. Desta forma o mesmo será descartado ao final desta pesquisa.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado durante a execução deste projeto deverão ser dados a (indicar o nome e forma de contato de um indivíduo a ser avisado):\_\_\_\_\_.

**Contato:**

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores no Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia, da Escola Paulista de Medicina da Unifesp, por escrito, por meio de carta ou fax, conforme endereço: Rua Napoleão de Barros, 715 - 2o. andar Hospital São Paulo. Vila Clementino CEP 04024-002 - São Paulo, SP - Brasil, Telefone/fax (11) 5576-4086.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP das 09:00hs às 13:00hs no endereço: Rua Botucatu, 572, 1º andar – Conjunto 14 – CEP: 04.023-061 – São Paulo/SP – tel: (11) 5571-1062 fax: (11) 5539-7162; site: <http://www.cep.unifesp.br>.

**O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).**

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Todos esses procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unifesp, que poderá ser consultado em caso de denúncias ou reclamações dos aspectos éticos pelo telefone (11) 5571-1062 ou pelo site <http://www.cep.unifesp.br>.

**Consentimento livre e esclarecido:**

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar sendo que recebi uma cópia de igual valor jurídico e de mesma fé pública a esta com a minha assinatura e a assinatura do pesquisador bem como a data do aceite de participação da pesquisa:

Nome do indivíduo:\_\_\_\_\_.

RG:\_\_\_\_\_ Orgão Emissor:\_\_\_\_\_ RG-HSP:\_\_\_\_\_ nºRH:\_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Nome do Pesquisador:\_\_\_\_\_.

RG:\_\_\_\_\_ Orgão Emissor:\_\_\_\_\_ CRM/SP:\_\_\_\_\_ Assi-

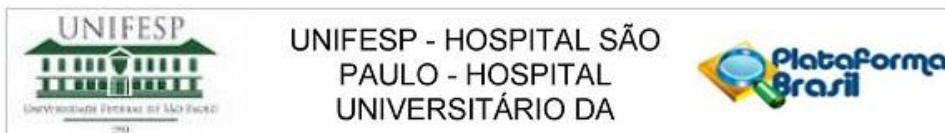
natura Pesquisador:\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

## APÊNDICE B - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS RETROSPECTIVOS

Caracterização molecular de azoospermia não obstrutiva e oligozoospermia grave  
Caio Graco Bruzaca A. Vilela, Ciro Dresch Martinhago e Renato Fraietta

Nome:	
RH:	
Nome da esposa:	
Data de nascimento:	
Idade ao início do tratamento (anos):	
Tempo de união (anos):	
Tempo de infertilidade até o início do tratamento (anos):	
Histórico familiar de infertilidade masculina ou outra;	
Histórico do testículo problemas desenvolvimento:	Orquiepididimite ( ) Lesão Testicular ( ) Varicocele ( ) Criptorquidia ( ) Cirurgia Prévia ( ) Outros ( ) _____
Hábitos de vida	Tabagismo: Fatores ambientais/ocupacionais: Alcoolismo: Uso de drogas:
Função sexual:	Ereção: ( ) normal ( ) Inadequada Ejaculação: ( ) normal ( ) Inadequada
Exame físico geral	Altura: Peso: IMC:
Exame físico do testículo	Temperatura adequada: ( ) Sim ( ) Não Dilatação do plexo pampiniiforme: E: ____ D: ____ Pênis: ( ) Normal ( ) cicatriz ( ) Placas ( ) outros: ____ Testículos: ( ) Ambos palpáveis ( ) anormais ( ) E/D Volume testicular (cm³): E ____ D ____ Consistência: ( ) Endurecido ( ) Normal ( ) Amolecido Epidídimos: Ductos deferentes: Aumento escrotal: Exame inguinal:
Exames complementares:	
Exames Laboratoriais	Fsh sérico ( / / ) em iu/l: Ref: 1,27-19,26 Lh sérico ( / / ) em iu/l: Ref: 1,24-8,62 Testosterona total sérica ( / / ) em ng/dl: Ref: 175-781 Estradiol sérico ( / / ) em pg/ml: Relação testosterona/estradiol: TSH ( / / ) em mcU/ml: T4 livre ( / / ) em ng/dl: Prolactina ( / / ) em ng/ml:
Análise seminal (Data: ____/____/____)	volume(ml): pH: Frutose: Dias de abstinência:
Cariótipo (Local onde foi realizado)	
Microdeleção do cromossomo Y (Local onde foi realizado)	

## ANEXO A: PARECER CONSUBSTANCIADO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AZOOSPERMIA NÃO OBSTRUTIVA OU OLIGOZOOSPERMIA GRAVE.

**Pesquisador:** Caio Graco Bruzaca

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas);

(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 79340617.1.1001.5505

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.469.142

#### Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n:1321/2017 (parecer final)

A azoospermia não obstrutiva e/ou oligozoospermia grave é uma causa prevalente de infertilidade masculina. Já existem fluxogramas bem estabelecidos para investigação de suas causas, entretanto, quando o perfil hormonal e a análise por citogenética convencional e das microdeleções do cromossomo Y estão sem alterações, a investigação se encerra e não há elucidação da causa da infertilidade masculina. Muitos estudos tentam utilizar-se de novas tecnologias para descrever as bases moleculares desse grupo de indivíduos. O presente projeto compreende um estudo monocêntrico nacional, parte retrospectivo e parte prospectivo, que envolverá pacientes com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave acompanhados no Hospital São Paulo. Os pacientes realizam ou realizaram consulta ambulatorial no serviço de Reprodução Humana e/ou Uro-infertilidade desta instituição, compreendendo avaliação clínica como parte de sua investigação diagnóstica e mantém seguimento regular no

**Endereço:** Rua Francisco de Castro, 55  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.469.142

serviço. Não haverá

participação de grupos vulneráveis, de modo que o termo de consentimento livre e esclarecido será dirigido aos próprios participantes. Os participantes serão informados do caráter voluntário do estudo e de que, em caso de não haver interesse na participação, será garantida a recusa ou a descontinuidade a qualquer momento, sem

repercussão nos cuidados médicos prestados pela equipe do ambulatório. Caso preencham os critérios de inclusão, serão convidados a participar do estudo. Os participantes em potencial serão informados sobre as características do estudo. Após explanação e compreensão adequada, participante e investigador assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido, sendo que uma via será entregue ao paciente, enquanto a outra será arquivada com os investigadores. Os procedimentos terão evolutiva da doença, antecedentes familiares e exame físico nos prontuários médicos (?retrospectivo?); e b) coleta de amostras de sangue periférico (aproximadamente 10 mL) para extração de DNA visando a realização dos estudos moleculares in vitro (?prospectivo?) de genes relacionados ao complexo sinaptonêmico. Não será utilizado material genético que já tenha sido coletado para estudo anterior (por exemplo, projeto CAAE), por isso não será solicitado ao CEP que a amostra possa ser usada neste novo estudo. Do mesmo modo, não haverá armazenamento de material biológico em biorrepositório, dispensando a necessidade deste. Estes procedimentos serão realizados nos dias de consulta ambulatorial rotineira, de modo que não está previsto ressarcimento das despesas de transporte. Além dos benefícios coletivos futuros pela construção do conhecimento científico, os resultados do estudo poderão trazer benefícios diretos no que se refere à confirmação de alterações relacionadas à azoospermia ou oligozoospermia grave, que poderá ser utilizada para fins de aconselhamento genético do participante. Esse aconselhamento genético, se solicitado, será feito pelo pesquisador responsável que é médico geneticista titulado e profissional apto para tal. Por fim, além de garantir a assistência durante e após o término do estudo, os pesquisadores asseguram o sigilo da identidade na divulgação dos resultados e que nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. As informações médicas que forem obtidas para esse estudo poderão ser registradas no prontuário, tornando-se disponíveis para outros médicos que possam atender os participantes no futuro.

#### Objetivo da Pesquisa:

-Hipótese: Há variantes nos genes relacionados ao complexo sinaptonêmico que justificariam a

**Endereço:** Rua Francisco de Castro, 55  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br





Continuação do Parecer: 2.469.142

alteração seminal. -

**Objetivo Primário:** Este trabalho tem como objetivo avaliar pacientes do sexo masculino com infertilidade de causa não obstrutiva com novas tecnologias de biologia molecular. **-Objetivo Secundário:** Descrever as variantes encontradas no genoma que possam estar relacionadas à azoospermia não obstrutiva ou à oligozoospermia grave. Realizar sequenciamento de nova geração a partir da criação de um painel gênico dos genes relacionados ao complexo sinaptonêmico

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara: **-Riscos:** Desconfortos e riscos: O risco para este estudo é semelhante a qualquer coleta de sangue. Pode haver desconforto na coleta do sangue como dor e pequeno sangramento, que na maioria dos casos é controlado com pressão local. Mesmo assim, há risco de formação de hematoma (mancha roxa). Todos são efeitos passageiros e considerados de baixo risco. Essa coleta será feita no dia da consulta médica no ambulatório por enfermeira ou médico. **-Benefícios:** Benefícios: Os resultados do estudo podem ter benefícios futuros para outros homens inférteis, mas também poderão ter benefícios diretos a você no que se refere à elucidação diagnóstica da causa da infertilidade, que poderá ser utilizada para fins de aconselhamento genético. Esse aconselhamento genético, se solicitado, será feito durante consulta médica no ambulatório de Reprodução Humana, pelo pesquisador responsável, que é médico geneticista titulado e profissional apto para tal.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

-Trata-se de projeto de mestrado de Caio Graco Bruzaca Almeida Vilela. Orientador: Prof. Dr. Renato Fraietta; Co-orientador: Prof. Dr. Ciro Dresch Martinhago. Projeto vinculado ao Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia, EPM, UNIFESP. -Estudo é Multicêntrico no Brasil. Demais Centros Participantes: DRESCH MARTINHAGO CLINICA

MEDICA S/S LTDA ? ME; responsável: CIRO DRESCH MARTINHAGO. TIPO DE ESTUDO: Trata-se de um estudo descritivo: Realização de coleta de sangue de pacientes com azoospermia não obstrutiva e oligozoospermia grave. Extração de DNA. Análise de sequenciamento de nova geração. Descrição de variantes relacionadas a alteração seminal. LOCAL: pacientes dos ambulatórios do Serviço Integrado de Reprodução Humana do Hospital São Paulo vinculado à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo ? Unifesp. Os experimentos serão realizados no Laboratório de Genética Molecular da Clínica Chromosome Medicina Genômica. PARTICIPANTES: indivíduos do sexo masculino, em investigação por azoospermia não obstrutivas (30 participantes) ou oligozoospermia grave (20

**Endereço:** Rua Francisco de Castro, 55  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.469.142

participantes). Serão pacientes do Serviço Integrado de Reprodução Humana, de 30 a 50 homens com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave, com idade compreendida entre 18 a 50 anos, que já realizaram cariótipo convencional com resultado normal para o sexo masculino e ausência de microdeleção do

cromossomo Y. -Critério de Exclusão: Serão excluídos os casos que apresentam outras causas de azoospermia, hipogonadismo hipogonadotrófico, agenésia bilateral congênita de ductos deferentes, avaliação por citogenética convencional anterior alterada e/ou presença de microdeleção nas regiões de fator de azoospermia (AZFa, AZFb e

AZFc), bem como aqueles em que houver recusa na participação no estudo. PROCEDIMENTOS: 1-Coleta de dados retrospectivos: Haverá revisão dos dados clínicos a partir dos prontuários médicos, compreendendo iniciais do paciente, idade, história evolutiva da azoospermia/oligozoospermia grave, histórico familiar e exame físico,

especialmente com relação aos achados relativos ao exame urológico. Também serão anotados resultados de exames relevantes ao caso, tais como perfil hormonal, cariótipo e as pesquisas de microdeleção do cromossomo Y. 2-Coleta de dados prospectivos: As amostras de sangue para obtenção de DNA serão obtidas a partir de punção de veia periférica por profissional habilitado (médico, enfermeira, técnico de enfermagem ou biomédico). Não será realizado nenhum procedimento in vivo que possa causar riscos ou desconfortos. Não será utilizada amostra de DNA coletada em

estudos anteriores e armazenadas. Todas amostras serão descartadas após o término desta pesquisa e não serão armazenadas em nenhum biorrepositório, dispensando a necessidade deste. 3-Estratégia de estudo: Após a coleta de sangue periférico, serão realizados os seguintes estudos: a)- Extração de DNA: Essa etapa tem por objetivo obter DNA genômico de elevada qualidade e de concentração apropriada a partir de uma amostra biológica./ b)- Sequenciamento de Nova Geração (NGS) utiliza a estratégia de sequenciamento massivo paralelo de DNA que possibilita a identificação de até bilhões de leituras de uma mesma sequência ao mesmo tempo.; c)-Desenho do Painel Genético; d)-Construção da Biblioteca: Nessa etapa as regiões alvo do DNA são fragmentadas em tamanhos específicos por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos. Outra estratégia de gerar uma biblioteca de fragmentos é a utilização de primers específicos para regiões-alvos de interesse e construir a biblioteca utilizando a técnica de PCR (biblioteca de Amplicons).; e)- Sequenciamento Esta etapa será realizada utilizando o kit Ion PGMTM Sequencing 400 (Life Technologies).

**Endereço:** Rua Francisco de Castro, 55  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1082 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.469.142

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente. 2-TCLE a ser aplicado aos participantes 3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil: a)-autorização da coep (Pasta: Declaração de Instituição e Infraestrutura Submissão 1;

Documento: COEP.pdf) 4- não foi encontrada a cópia do cadastro CEP/UNIFESP

**Recomendações:**

ATENÇÃO: adequar o TCLE antes de sua aplicação: Atenção: o CEP/UNIFESP mudou de endereço: favor corrigir no TCLE. Novo endereço: Rua Prof. Francisco de Castro, n: 55, - 04020-050. O E-mail é: CEP@unifesp.edu.br. Os telefones continuam os mesmos (011-5571-1062; 011-5539-7162

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de resposta a pendências.Todas as inadequações foram adequadamente solucionadas e o projeto pode ser aprovado.

1. No projeto, pg 12, está informado que "as amostras de sangue já foram coletadas e armazenadas adequadamente"; no entanto, no TCLE, que deverá ser aplicado ao paciente selecionado, está informado que será coletada amostra de sangue. Favor esclarecer e adequar.

RESPOSTA: Foram adequadas as questões relativas na pagina 12 quanto a coleta e armazenamento de material biológico. Também foi acrescentado que poderá ser coletado saliva ao invés de sangue, ambas as amostras poderão ser extraídas para obtenção de DNA.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que, a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1000449.pdf	22/12/2017 12:02:53		Aceito

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br





Continuação do Parecer: 2.469.142

Outros	Anuencia.pdf	22/12/2017 12:01:01	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Outros	Aoparecerista.docx	22/12/2017 12:00:27	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Outros	CEP.pdf	22/12/2017 11:59:37	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Azospermia_modificado.pdf	22/12/2017 11:58:27	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	COEP.pdf	15/12/2017 11:09:28	Caio Graco Bruzaca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Azoospermia_Modificado.docx	15/12/2017 10:53:33	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	25/10/2017 13:14:25	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	25/10/2017 13:11:46	Caio Graco Bruzaca	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	25/10/2017 13:10:53	Caio Graco Bruzaca	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 17 de Janeiro de 2018

Assinado por:  
Miguel Roberto Jorge  
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br